

**Polymer blends containing polymer of beta -hydroxybutyric acid and chlorine or nitrile group containing polymer**

Patent Number: ☐ US4393167  
Publication date: 1983-07-12  
Inventor(s): HOLMES PAUL A [GB]; WILLMOUTH FRANK M [GB]; NEWTON ALAN B [GB]  
Applicant(s): ICI PLC [GB]  
Requested Patent: ☐ JP57150393  
Application Number: US19810320127 19811110  
Priority Number (s): GB19800036967 19801118  
IPC Classification: C08L27/06; C08L33/18; C08L67/04  
EC Classification: C08G63/06, C08L67/04, C12P7/62A  
Equivalents: DE3168826D, ☐ EP0052460, B1, JP1782389C, JP1782493C, JP1888568C, ☐ JP3149255, JP4069186B, JP4070342B, ☐ JP57111349, JP6015604B

**Abstract**

Polymer blends containing (i) 0.2-95% by weight of a high molecular weight beta -hydroxybutyric acid homo- or copolymer and (ii) a polymer containing at least 25% by weight of chlorine or nitrile groups, such as chlorinated polyethylene, polyvinyl chloride, or a high acrylonitrile resin. In small quantities the beta -hydroxybutyric acid polymer acts as a processing aid for the chlorine or nitrile containing polymer. In larger quantities the properties of the beta -hydroxybutyric acid polymer or the chlorine or nitrile containing polymer are improved.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-150393

⑪ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和57年(1982)9月17日

C<sup>12</sup> P<sup>7</sup>/42

6760-4B

発明の数 2

C-08 G 63/06

7919-4J

審査請求 未請求

(全 18 頁)

⑭ β-ヒドロキシブチレート重合体およびその製造法

イギリス国クリーブランド・ストックトン・オン・ティーズ・ノートン・ザ・グリーン・ノートン・ホール(番地なし)

⑯ 特 願 昭56-185153

⑰ 出 願 昭56(1981)11月18日

⑱ 出 願 人 インペリアル・ケミカル・インダストリーズ・ピーエルシー

優先権主張 ⑲ 1980年11月18日 ⑳ イギリス (GB) ⑳ 8036967

イギリス国ロンドン市エスタブリユー1ビー3ジエイエフ・ミルバンク・インペリアル・ケミカル・ハウス(番地なし)

㉑ 発 明 者 ポール・アーサー・ホルムス  
イギリス国クリーブランド・ストックトン・オン・ティーズ・ノートン・ザ・グリーン・ノートン・ホール(番地なし)

㉒ 代 理 人 弁理士 湯浅恭三 外2名  
最終頁に続く

㉓ 発 明 者 スティーブン・ヒュー・コリンズ

明 細 書

1. [発明の名称]

β-ヒドロキシブチレート重合体およびその製造法

2. [特許請求の範囲]

(1) 重量平均分子量10000以上を有し、次の繰返し単位Iを99.9ないし50モル%



および次の繰返し単位IIを0.1ないし50モル%



(式中nは0または1、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ および $R^4$ はそれぞれ炭化水素基；ハロまたはヒドロキシ-置換炭化水素基；ヒドロキシ基；ハロゲン原子および水素原子から選択するが、nが1のときは $R^3$ 、 $R^4$ および $R^5$ はそれぞれ水素原子で、 $R^1$ はメチル基ではない)

を含む共重合体。

(2) nが1である特許請求の範囲第1項記載の共重合体。

(3)  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ および $R^4$ はそれぞれ4個以下

の炭素原子を含む基である特許請求の範囲第1項または第2項記載の共重合体。

(4)  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ および $R^4$ の少なくとも一つが水素原子である特許請求の範囲第1項ないし第3項の何れかに記載の共重合体。

(5)  $R^1$ 、 $R^2$ および $R^3$ がそれぞれ水素原子である特許請求の範囲第4項記載の共重合体。

(6)  $R^1$ がエチル基である特許請求の範囲第1項ないし第5項の何れかに記載の共重合体。

(7) 重量平均分子量20000以上を有する特許請求の範囲第1項ないし第6項の何れかに記載の共重合体。

(8) 繰返し単位を1ないし40モル%含む特許請求の範囲第1項ないし第7項の何れかに記載の共重合体。

(9) ポリエステルを蓄積できる微生物を、水溶性、同化性炭素含有基質の水性培地で、培養の少なくとも一部は微生物繁殖の必須要件の一つまたはそれ以上を制限するがポリエステル蓄積を制限しない条件下で培養する熱可塑性ポリエステルの製造

法において、培養を制限した期間の少なくとも一部の間に、基質がこの制限された条件下で微生物により繰返し単位 $-OCH(CH_2)CH_2CO-$ のみよりなる以外のポリエステルに代謝できる有機酸またはその塩よりなることを特徴とする方法。

(10) 酸をプロピオン酸、酪酸およびアクリル酸より選択する特許請求の範囲第9項記載の方法。

(11) 微生物繁殖の必須要件の一つまたはそれ以上を制限するが、ポリエステルの蓄積を制限しない条件下で、微生物の培養を行う期間の少なくとも一部のとき、酸を唯一の基質とする特許請求の範囲第9項または第10項記載の方法。

(12) 酸が微生物培養の全期間を通じての唯一の基質である特許請求の範囲第11項記載の方法。

(13) 基質として炭化水素を用いて微生物を繁殖させる特許請求の範囲第9項ないし第11項の何れかに記載の方法。

(14) 炭化水素がグルコースである特許請求の範囲第18項記載の方法。

(15) 培養が微生物繁殖の必須要件の一つまたはそ

れ以上を制限するが、ポリエステルの蓄積を制限しない条件下である期間の少なくとも一部のときの基質が、酸および炭水化物の混合物である特許請求の範囲第18項または第14項記載の方法。

(16) 制限する繁殖の必須要件である~~が~~ポリエステルの蓄積には必須要件でないのは、炭素源である特許請求の範囲第9項ないし第15項の何れかに記載の方法。

### 2. [発明の詳細な説明]

この発明は、ポリ $\beta$ -ヒドロキシ酪酸（以下PHBと略記する）に関する。

PHBは、微生物細胞内部で粒子状のエネルギー貯蔵物質として、種々の微生物、主としてバクテリアにより蓄積される。

このような細胞から抽出したPHBは、次の繰返し単位の熱可塑性ポリエステルであり、



急速に比較的高いレベルまで結晶化し、例えば7-9またはそれ以上のオーダーである。この結晶化挙動は、重合体を例えば成形用材料として使

用するときには、しばしば欠点となる。

この発明により、PHBの結晶化は、重合体鎖に非類似単量体単位を組み入れることで変性できることが判明した。

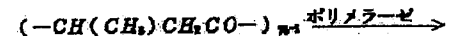
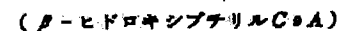
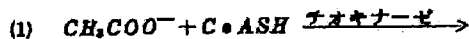
下記の重合体合成を導く代謝経路の説明では、次の略号を用いた：

$C_4ASH$ は、末エステル化糖酵素Aである。したがって $CH_3COSC_4A$ は糖酵素Aのアセチルチオエステルで、一般にアセチル $C_4A$ と命名している。

$NADP$ は、酸化状態のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドである。 $NADPH_2$ は、還元した $NADP$ である。

微生物によるPHBの生合成における第1工程は、アセチル $C_4A$ の合成と考えられる。これは、例えば糖酵素Aと酢酸エステル、またはビルベート（炭水化物のグリコリシス（解糖）生成物またはオキサロアセテート（トリカルボン酸(TCA)サイクルまたはクレブサイクル）の一員である）の脱カルボキシル化で生成する）の脱カルボキシル化により形成される。

したがって、アセチル $C_4A$ 源としての酢酸エステルで、PHBは次の反応を含む代謝経路で製造される：



ここで $(-OCH(CH_2)CH_2CO-)_{n-1}$ は $(n-1)$ 個の繰返し単位を含むPHBである。したがって、反応(4)は、 $-OCH(CH_2)CH_2CO-$ 単位を重合体鎖に附加する。

この発明により、ある種の有機酸の存在下、一定条件下で微生物を培養することにより、重合体鎖に少割合の共単量体単位を導入できることが

判明した。プラスチック材料として実用的用途のためには、重量平均分子量 ( $M_w$ ) 10,000以上 (例えばゲル透過クロマトグラフィーで測定) でなければならない。

したがって、この発明により重量平均分子量 10,000以上で繰返し単位



99.9ないし50モル%および繰返し単位



0.1ないし50モル%を有する共重合体を提供する。

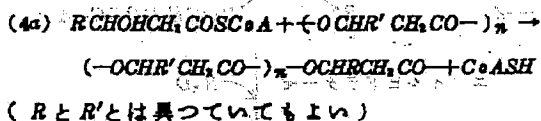
(式中  $n$  は 0 または 1、 $R^1, R^2, R^3$  および  $R^4$  はそれぞれ炭化水素基、例えばアルキル基、アラルキル基、アリール基またはアルカリール基、ハロ-およびヒドロキシ-置換炭化水素基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子および水素原子から選択する、ただし  $n=1$ 、 $R^1, R^2$  および  $R^4$  がそれぞれ水素原子のとき、 $R^3$  はメチル基ではない)。

基  $R^1, R^2, R^3$  および  $R^4$  は、それぞれ4個以下の炭素原子を含むものが好ましい。一般に、基

変性し次のようにして一般式  $RCOCH_2COSC \cdot A$  の脂肪族アシルチオエステルを還元する：



反応(4)のポリメラーゼ酵素は、絶対特異性ではない。一般的反応は、次のように示される：



したがって、このルートは、次の単位を含む重合体になる：



即ち単位  $-OCR^1R^2CR^3R^4CO-$

( $R^1, R^2$  および  $R^4$  はそれぞれ水素原子)

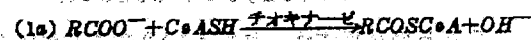
もし、若干の繰返し単位中、 $R^1$  がメチルでなければ、共重合体が得られる。

反応(4a)の反応体である  $\beta$ -ヒドロキシチオエステル、例えば  $RCHOHCH_2COSC \cdot A$  は、場合により、非特異性脂肪族代謝酵素エノイルヒドラーゼにより触媒される反応によつても製造され

$R^1, R^2, R^3$  および  $R^4$  の少なくとも1個は、水素原子である。

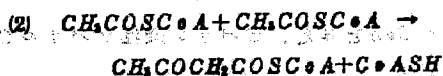
用いる各酵素はある程度の非特異性を有しているので、このような共重合体が製造できる。

反応(1)に関与する酵素チオキナーゼは、広範な特異性を有し、チオキナーゼは次の反応により、補酵素  $A$  を種々の他のカルボキシ基に結合させる：

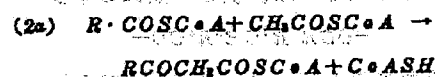


(プロピオニル  $C \cdot A$ )

酵素  $\beta$ -ケトチオラーゼが関与する反応(2)は、次のように示される：

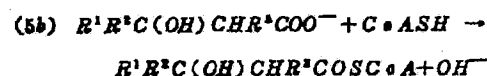
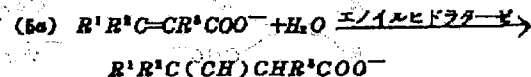


この反応は一部特異的で、一万の反応体はアセチル  $C \cdot A$  でなければならない。したがって、一般的な反応は、次の通りである：



同様に、反応(3)のレダクターゼ酵素の特異性は、

る：



[反応(5a)、(5b)は、逆にすることもできる、即ち炭素-炭素二重結合の水素化は、チオエステル化反応の後に行きてもよい]。 $R^1, R^2$  および  $R^3$  は、必ずしも水素原子でなくてもよい。

したがって、反応(5a)、(5b)および(4a)を用いて、次式の単位を重合体鎖に導入することもできる：

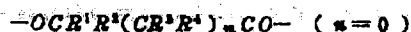


即ち、単位  $-OCR^1R^2CR^3R^4O-$  ( $R^4=H$ )。したがって、もし  $R^2$  および  $R^3$  がそれぞれ水素原子でなく、繰返し単位  $R^1$  の若干がメチル基でなければ、共重合体が得られる。

反応(4a)のポリメラーゼ酵素も非特異性であつて、 $\alpha$ -位置にヒドロキシ基を有する反応体、例えば次のタイプのもの



即ち単位



を重合体鎖に導入する。

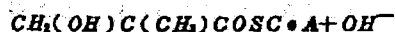
場合によつては、このポリメラーゼ酵素は、次の一般式のβ-ヒドロキシ反応体も変化する：



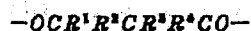
これらの反応体は、反応(1b)により対応するβ-ヒドロキシ酸から作られる：



例えば、β-ヒドロキシ酸はβ-ヒドロキシブチルCoAを与え、ピバリン酸はピバリルCoAを与える：



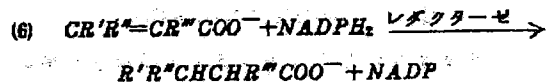
このような反応体は、次の一般式の単位



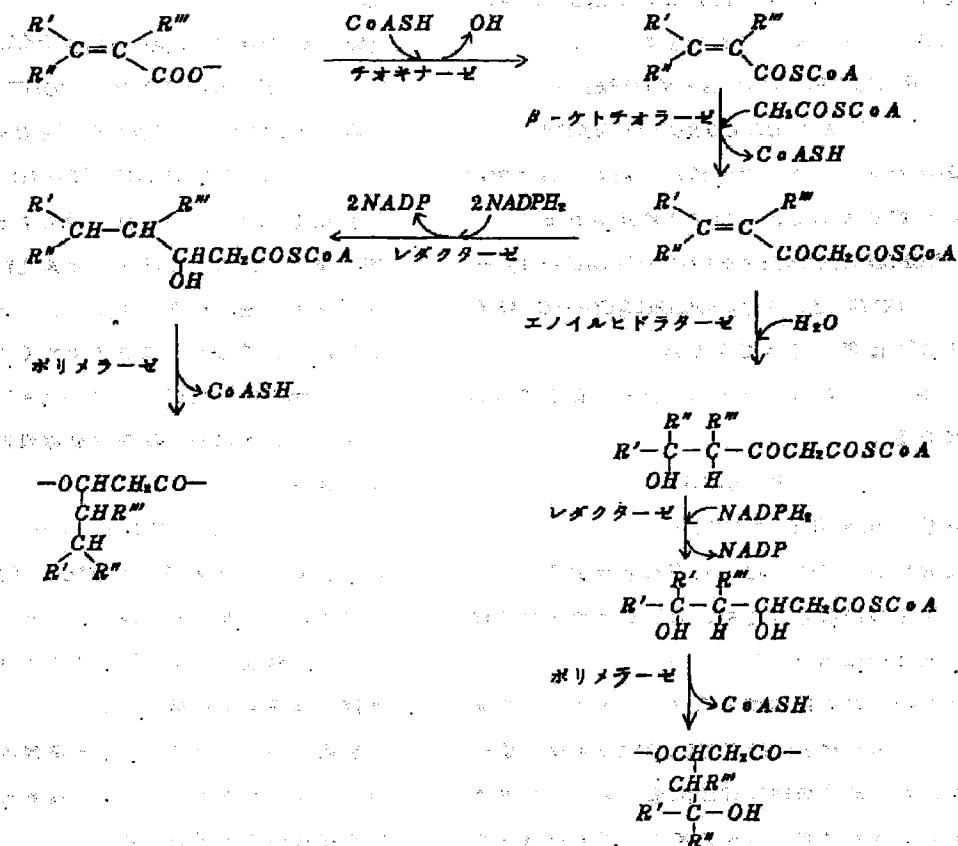
を重合体鎖に導入し、 $R^2, R^3$  および  $R^4$  がそれぞれ水素原子で、繰返し単位  $R^1$  の若干がメチル基

でなければ、共重合体が得られる。

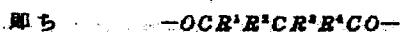
不飽和酸では、反応(5a)の代りに反応(5b)が起き、重合体合成は反応(2a)および(3a)を含むルートの外に、例えば反応(5a)による炭素-炭素二重結合の水素化または炭素-炭素二重結合の還元により進行し、例えば次の反応による：



したがって、一つの可能な順序は、次の通りである：



したがって、これらの単位は、次の単位を含む共重合体を与える：



この場合  $R^2$ ,  $R^3$  および  $R^4$  は、それぞれ水素原子で、 $R^1$  は



である。

共重合体中の繰返し単位 II の割合は、共重合体の全繰返し単位の 0.1 ないし 5.0 モル分、特に 1 ないし 4.0 モル分である。場合によつては、微生物により得られる重合体は、繰返し単位 I のホモ重合体と繰返し単位 I および II を含む共重合体との混合物である。この場合、重合体中の繰返し単位 II の全体の割合は、全繰返し単位の 0.1 ないし 5.0 モル分である。好ましくは、繰返し単位 II の割合は、3 ないし 3.0 モル分である。

この発明により、上記の反応のコースに従う代りに、微生物は、上記の反応に加えてまたはその若干の代りに脱酸反応を行い、3-位置のヒドロ

いる。Davis によれば、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸単位および次の 3-ヒドロキシ-2-ブテノン酸単位



を含む共重合体であるとされているこれら重合体は、*Nocardia* を 3-ブタンに培養して製造できる。

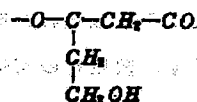
Wallen 外は *Environmental Science and Technology* 6 (1972) p. 161~164 および 8 (1974) p. 5776~5791 に、活性汚泥から分離し反覆洗浄後融点 97~100℃で、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸単位および次の  $\beta$ -ヒドロキシピバリン酸単位



を 1:5 の比で含む重合体を発表している。

Marchessault 外は、*IUPAC Macromolecular Science 1980 International Symposium on Macromolecules Preprints* 2 (1980) p. 272~275 に、この化合物の研究を報告し、主として  $\beta$ -ヒドロキシピバリン酸単位を含むことを確認している。

キシ基を介して重合体鎖に結合した  $\beta$ -ヒドロキシピバリン酸単位および/または次の 3-5-ジヒドロキシペンタノン酸単位



を含む重合体を与える。したがって、共重合体は、次の単位を含んでいる：



(式中  $R^1$  は、エチル基または 2-ヒドロキシエチル基)。

$n=1$ 、 $R^1$  がエチル基、 $R^1$ ,  $R^2$  および  $R^4$  がそれぞれ水素原子の共重合体が好ましい。

$\beta$ -ヒドロキシ酪酸単位即ち次の単位



および他の単位を含むある種の重合体は、既に文献に記載されている。

エチレン性不飽和を示す赤外バンドを示す重合体が、Davis により *Applied Microbiology* 12 (1964) p. 801~804 に発表されて

USP 3275610 に、ある種の微生物、

特に *Nocardia salmonicida* を炭素数 4 個を含むカルボン酸に培養するポリエステル類の微生物学的製造法が示されている。実施例 2 および 8 では、それぞれ 3-ブテノン酸および  $\alpha$ -ヒドロキシ酪酸を用い、重合体は示された融点の 178~184℃のオーダーからポリ  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸である。しかし、実施例 1 では、2-メチルアクリル酸(メタクリル酸)を用い、得られる重合体は同定していないが、融点 215~220℃を有しかつメチルエチルケトンに可溶性と説明されている。これに対し、この発明の主とし  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸残基を含む共重合体は、融点 180℃以下で冷メチルエチルケトンに不溶性である。

*P.H.B* 蓄積性微生物を、適当な基質、即ちエノルゲールおよび炭素源に好氣的に培養すると、微生物は増殖のための必須要件の一つまたはそれ以上が消費されるまで増殖する。以下においてこの微生物の増殖を、“繁殖”と称する。繁殖必須要件の一つが消費されたとき、その後の繁殖は、もし

あつたとしても極めて限られた程度であるが、基質は消費され、<sup>かゝり</sup>PHBは微生物に蓄積される。

ある種の微生物では、PHB誘発抑制因子、例えば1つまたはそれ以上の繁殖必須要件の制限が存在しなくても、微生物の繁殖中にPHBは蓄積するであろう；しかし、このように蓄積したPHBの量は一般に少量で、代表的には得られる細胞の約10wt%以下である。したがつて、バッチ式培養で繁殖したとき、1つまたはそれ以上の繁殖必須要件が消費されるまでは、殆んどPHB蓄積なしで微生物は繁殖し、その後微生物はPHBを合成する。

この発明により、共重合体を製造するために、繁殖のための必須要件の1つまたはそれ以上の量を制限するが、PHB蓄積は制限しない条件下での微生物の培養中、基質の少なくとも一部として一般に共単量体単位になる酸を用いる必要があることが判明した。繁殖の必須要件の制限を行わないときは、一般に酸は微生物により別の経路で代謝され、例えばアセチルCoAまたはTCAサイク

ルの一員になり、共重合体は製造されなくなる。したがつて、一例として、何らの繁殖制限なしではプロピオン酸は微生物により代謝され、プロピオニルCoAを経て炭酸ガスを取り込みメチルマロニルCoA、次いでTCAサイクルの一員であるサクシネートになる。

したがつて、この発明により、ポリエステルを蓄積できる微生物を、水溶性、同化性炭素含有基質の水性培地で、培養の少なくとも一部は微生物繁殖の1つまたはそれ以上の必須要件を制限するがポリエステル蓄積は制限しない条件下で培養を実施して、熱可塑性ポリエステルを製造する方法において、培養を制限した期間の少なくとも一部の間で、基質がこの制限された条件下で微生物により、 $-OCH(CH_3)CH_2CO-$ 繰返し単位のみよりなる以外のポリエステルに代謝できる有機酸またはその塩よりなることを特徴とする方法を提供する。

この点に関し、前記のUSP 3,275,610では得られる細胞の量は、繁殖制限が行われなかつ

たような量である。

基質および酸素（これは一般に酸酵器の水性培地に空気を注入して供給される）に加えて、各種の栄養塩類が微生物が繁殖するために必要である。したがつて、一般に同化できる形態の次の元素源（普通は水溶性塩）が必要である：窒素、リン、イオウ、カリ、ナトリウム、マグネシウム、カルシウムおよび鉄とともに微量元素、例えばマンガン、亜鉛および銅。酸素の酸酵器への供給を制限してポリエステル蓄積を誘発することも可能であるが、1種またはそれ以上の栄養塩の量を制限するのが好ましい。制限するのに最も実用的な元素は、窒素、リンであり、好ましくないのはマグネシウム、イオウまたはカリである。これらの中でも、窒素（これはアンモニウム塩で供給するのが便利である）の量を制限するのが最も好ましい。必要とする同化性窒素の量は、ポリエステル蓄積の少ない細胞の所望重量の約8~15%である。

酸酵は、水性培地1g当りポリエステル含有細

胞の乾燥重量が少なくとも5gになるように行ひのが好ましい。したがつて、もし例えばPHB含有量40wt%のPHB含有細胞を10g/lで作ろうとすれば、細胞繁殖量制限に用いるのに酸酵器に供給する必須栄養の量は、PHBを含まない細胞8g/lの繁殖を支持するのに要する量である；したがつて、もし窒素を繁殖制限栄養として用いれば、PHBを含まない細胞の窒素含有量は約8~15wt%であるから、必要な同化性窒素の量は約0.5~0.9g/lであり、例えばアンモニアイオン0.6~1.2g/lである。

酸酵は、例えばpH、温度および曝気の種類（酸素を制限栄養源としないとき）を微生物に対し常用する条件下で行う。同様に、用いる栄養塩類（その使用量は上記の条件を考慮して決定した、繁殖制限栄養源以外）は、微生物の繁殖に通常用いる量である。

微生物は、容易に代謝できる基質、例えば炭水化物に対し、重合体蓄積段階で制限すべき繁殖用に必要で充分の栄養源の存在下に、培養により所

望の重量まで繁殖させるのが好ましい。場合により、繁殖段階の少なくとも一部、また場合によっては全部に対する基質は、重合体蓄積段階で繰返し単位Ⅱになる酸である。

酸酵は、繁殖には必要であるが重合体蓄積には必要でない栄養源の量が消耗したときに、重合体蓄積が起こるパッチ式酸酵で行われる。別法として、酸酵は、新鮮な水性培地および基質の添加速度に対応する速度で、酸酵容器からバクテリア細胞を含む水性培地を連続的または間欠的に除去する連続式酸酵で行う。酸酵容器に供給する制限した栄養源の量は、容器から除去した水性培地がこの栄養源を殆んど含まぬような量で、容器から除去した水性培地を、次いでパッチ式または好ましくは連続式で操業する第2酸酵容器に供給し、共重合体生産性酸を含む新鮮な基質の添加で、通気培養を継続して重合体蓄積を起こさせる。この追加酸酵工程で、追加量の基質および栄養塩類を添加するが、追加繁殖は一般に好ましくないので、制限繁殖に用いる栄養源は加えるべきではない。

のみを与える基質が、唯一の基質である。

場合によつては、この経路に必要な酵素をブロックすることおよび／または必要な酵素合成の能力のない微生物を用いることにより、酸のアセチルCoAへの通常の代謝を阻止することも可能である。しかし、実質的収量の重合体を得るために、繁殖に要する栄養を制限し、好ましくは消耗した条件下での一定期間の培養が、一般に好ましい。

酸酵は、蓄積したポリエステルの量が、バクテリア細胞の約50～80wt%になるように行うのが好ましい。

共重合体を得るのに用いられる酸は、培養が繁殖制限状態であるとき、繰返し単位Ⅰのみにならないものである。したがって、不適当な酸には酢酸およびβ-ヒドロキシ酪酸、TCAサイクルのメンバー、および培養が繁殖制限状態になるときアセチルCoAのみを与える酸および／またはTCAサイクルのメンバーである。したがって、不適当な酸には、ホスホグリセリン酸、ピルビン酸、クエン酸、イソクエン酸、α-ケトグルタル酸、コ

しかし、第1酸酵器から別の1個またはそれ以上の酸酵器に供給した水性培地に、制限栄養源が若干の残存量を含むことおよび／またはその少量を添加することが、効果的な操業に好ましい。

上記のパッチ式または連続式の何れの場合も、共重合体繰返し単位Ⅱを与えるのに用い<sup>る</sup>酸は、繁殖に必要な栄養が消耗したときに起きる、重合体蓄積段階中の基質の一部または全部として用いる。この酸は、反覆単位Ⅰを与える基質、例えば炭水物との混合物で用いるか、または唯一の基質が用いられる；後者の場合、十分な酸が、アセチルCoAへの別の経路で代謝されて繰返し単位Ⅰを与え、もし別の経路が反応(2a)を含めば、繰返し単位Ⅱを得るのに必要を任意のアセチルCoAが用いられる。しかし、酸が唯一の基質であれば、重合体収量は往々にして低下する。

繰返し単位Ⅱを与える酸は、重合体蓄積段階の一部のみに存在させることもできる；酸が存在する重合体蓄積段階の部分の前および／または後<sup>に</sup>に起きる、重合体蓄積段階の残りでは、繰<sup>し</sup>返し単位Ⅰ

ヘク酸、フマル酸、マレイン酸、リンゴ酸、オキサリ酢酸、オキサロコヘク酸、アコニト酸およびメチルマロン酸がある。アミノ酸も、同様に不適当である。β-酸化によつてβ-ヒドロキシ酪酸になる酪酸も、同じく不適当である。酵素チオキナーゼは補酵素Aをγ酸エステルに附加しないので、γ酸は共重合体を与えない。

適当な酸は、プロピオン酸、イソ酪酸、これらおよび酪酸のヘロまたはヒドロキシ置換誘導体、例えば3-クロロプロピオン酸、β-ヒドロキシプロピオン酸、α-ヒドロキシ酪酸(β-ヒドロキシ酪酸は不適当)、ビバリン酸、ヘロ酢酸、フェニル酢酸および安息香酸、およびこれらの不飽和酸またはヘロ置換誘導体、例えばアクリル酸、メタクリル酸(2-メチルアクリル酸)、β,β-ジメチルアクリル酸、2,3-ジメチルアクリル酸、β-クロロプロピオン酸および2-クロロプロピオン酸である。

基質は水溶性でなければならず、酸は水溶性であればそのまま、または水溶性塩例えばアルカリ



金属塩で添加する。上記の通り、場合によつては、

微生物はさらに酸との反応を行うこともある。し

たがつて、イソ酪酸は  $n=1$ 、 $R^2=R^3=R^4=H$ 、

$R$  = イソプロピル基の繰返し単位 II を与える。  $n$

$=1$ 、 $R^2=R^3=R^4=H$ 、 $R^1$  = エチル基の繰返し

単位 II があり、微生物が共重合体への代謝経路中

で、メチル基を水素で置換することを示している。

種々の酸に対する、繰返し単位 II の  $n$ 、 $R^1$ 、

$R^2$ 、 $R^3$  および  $R^4$  は次の通りである。

酸	$R^1$	$R^2$	$R^3$	$R^4$	$n$
プロピオン酸	エチル*	H	H	H	1
イソ酪酸	イソプロピル*	H	H	H	1
8-クロロプロピオン酸	2-クロロエチル***	H	H	H	1
8-ヒドロキシプロピオン酸	水素または2-ヒドロキシエチル	H	H	H	1
アクリル酸	水素または2-ヒドロキシエチル**	H	H	H	1
8,8-ジメチルアクリル酸	メチルまたは2-メチルプロ ピル*または2-ヒドロキシ- 2-メチルプロピル	メチル H H	H H H	H H H	1 1 1
2,8-ジメチルアクリル酸	メチルまたは1-メチル-2 -ヒドロキシプロピルまたは 1-メチルプロピル*	H H H	メチル H H	H H H	1 1 1
2-メチルアクリル酸	水素またはイソプロピル* または1-メチル-2-ヒド ロキシエチル	H H H	メチル H H	H H H	1 1 1
8-クロロプロピオン酸	Cl または2-クロロエチル または2-クロロ-2-ヒド ロキシエチル	H H	H H	H H	1 1

酸	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	n
2-クロロプロピオン酸	水素または1-クロロエチル	H	Cl	H	1
	または1-クロロ-2-ヒドロキシエチル	H	H	H	1
	ロキシエチル	H	H	H	1
クロロ酢酸	クロロメチル****	H	H	H	1
α-ヒドロキシ酪酸	エチル	H	—	—	0
ピバリン酸	水素	H	メチル	メチル	1

注:

\* エチル存在

\*\* 2-ヒドロキシエチル存在

\*\*\* エチルおよび2-ヒドロキシエチル存在

\*\*\*\* メチル存在

使用できる微生物は、共重合体を製造しようとする酸またはその塩を同化できる任意のポリ-α-ヒドロキシ酪酸蓄積性微生物である。バクテリア *Alcaligenes eutrophus* (従来は *Hydrogenomonas eutrophus* として知られていた) 種、例えばこの種の学術的研究に広く用いられた H16 株、(ATCC 417699, *J General Microbiology* (1979) 115, p. 185~192 参照) および H16 株の変異株、例えば 11/7B、S801/C5、S501/C29 および S501/C41 (それぞれ the National Collection of Industrial Bacteria, Terry Research Station, Aberdeen, Scotland K. 1980 年 8 月 18 日に寄託した、NCIB 411600、11599、11597 および 11598) が特に適している。ATCC 番号は、the American Type Culture Collection, 12801 Park Lawn Drive, Rockville, Maryland 20852 U.S.A. で与えられた番号である。上記の通り、繁殖段階中、炭水化物を基質として用いるのが好

ましい。*Alcaligenes eutrophus* H16 株 (ATCC 417699) は、グルコースを酸化しないが、その変異株例えば上記の 11/7B、S801/C5、S501/C29 および S501/C41 は、グルコースを酸化できる。炭水化物、特にグルコースは、コストの面および微生物が効果的に繁殖できるので、繁殖段階での好ましい基質である。

ポリエステルは、微生物細胞内部の顆粒として製造される。ポリエステルを含有する細胞は、例えば USP 3107172 に示すように、そのまま成形材料として用いられるが、一般にポリエステルを、バクテリア細胞から分離するのが好ましい。これは、細胞を細胞崩壊、次いで適当な溶剤でポリエステルを抽出することによって達成される。適当な抽出処理の例は、ヨーロッパ特許出願第 15128 号に記載されている。

上記の通り、重合体が実用できるためには、グルコースクロマトグラフィーで測定した重量平均分子量 ( $M_w$ ) 10,000 以上でなければならない。

好ましくは、 $M_w$  は50,000以上、より好ましくは100,000以上、特に200,000以上である。

共重合体は、常にD-立体配置を有し、D-ヒドロキシ酪酸ホモ重合体よりも低い融点を示す。

共重合体は、熔融成形品の製造に特に有用であり、この場合D-ヒドロキシ酪酸に匹敵する還元結晶化度が好ましい。

特に興味深いのは、少量の共重合体の塩化ビニルホモ重合体の高分子量加工助剤としての用途である。この応用では、共重合体の量は、塩化ビニル重合体に対し0.5~10wt%である。最良の結果を得るには、共重合体はランダムでなければならない。ランダム共重合体を得るには、共単体単位IIを得るのに用いる酸は、少なくとも繁殖要件制限条件下での微生物の培養期間を通じて唯一の基質として存在するのが好ましい。

共重合体は、熔融押出し後、好ましくは重合体のガラス転移点( $T_g$ )と融点との間の温度で、一對またはそれ以上のロールを通過させて、フィルム

の厚さを減少しかつ若干の分子配向を導入するフィルム製造にも用いられる。

この発明を、以下の実施例で説明する。

#### 実施例 1

プロピオネートの通常の代謝では、プロピオネートはサクシネートに変換し、これはTCAサイクルのオキサロ酢酸への酸化、次いで脱カルボキシル化によりアセチルCoAになる。オキサロ酢酸の脱カルボキシル化では、両方の末端炭基は炭酸ガスとして除去される。したがって、もしカルボキシル基に放射性ラベルした炭素原子を有するプロピオネート、即ち1- $^{14}C$ -プロピオネートを、アセチルCoAへの細胞変換に供給すれば、 $^{14}CO_2$ として放射能は失われる。重合体への何らかの $^{14}C$ の組み込みは、プロピオニルCoAのD-ヒドロキシバレルルCoAへの変換、引き続き重合からもたらされる。

#### *Alcaligenes eutrophus* 変異株 NCIB

11599を、8.5g/lの蓄積ポリエステルを支持するに充分な同化性炭素および基質としての

グルコースを含む水性培地Aを用いるバッチ式醗酵器で、通気培養により繁殖させた。水性培地Aは、脱イオン水1l当たり次の組成を有していた。

$(NH_4)_2SO_4$	2g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.8g
$K_2SO_4$	0.45g
$H_2PO_4$ (1.1M)	1.2ml
$F_2SO_4 \cdot 7H_2O$	15mg
微量元素溶液	2.4ml

微量元素溶液は、脱イオン水1l当たり次の組成を有していた。

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.02g
$ZnSO_4 \cdot 6H_2O$	0.1g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.1g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.6g

生体濃度が4.5g/lに達したとき、即ち糸の同化性炭素が枯渇した後、1- $^{14}C$ -プロピオネートを含むプロピオン酸ソーダ1g/lをグルコースとともに醗酵器に加え、醗酵を5分間継続した。次いで、細胞を浮遊により回収し、重合体を

クロロホルムで抽出した。ラベルした炭素は、殆んど完全にクロロホルム溶液にあり、ラベルした末端炭素原子が炭酸ガスとして損失しなかつたことを示した。したがって、少なくとも残りのプロピオネートは、アセチルCoAとして以外に重合体に組み込まれた。

#### 実施例 2 (比較例)

#### *Alcaligenes eutrophus* 変異株 NCIB

11599を、脱イオン水1l当たり次の組成を有する水性培地B4000mlを含む5lバッチ式醗酵器で、pH 6.8、34℃で通気培養により繁殖させた。

$(NH_4)_2SO_4$	4g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.8g
$K_2SO_4$	0.45g
$H_2PO_4$ (1.1M)	1.2ml
$F_2SO_4 \cdot 7H_2O$	15mg
実施例1で用いた 微量元素溶液	2.4ml

グルコースを、8g/lrの割合で醗酵器に供給

した。増培Bの同化性窒素の量は、2.6gのPHBを含ませ細胞を支持するに充分であつた。

40時間後、細胞を遠心分離で回収した。細胞を凍結乾燥し、重合体をクロロホルムで抽出した。

#### 実施例 3

実施例2を繰返したが、細胞重量3.4gに達したとき、グルコースの代りにプロピオン酸を2.8g/hrの割合で醗酵器に供給した。

#### 実施例 4

実施例3を繰返したが、プロピオン酸の供給は細胞重量3.9gに達したときに開始した。

#### 実施例 5

実施例3を繰返したが、プロピオン酸の供給は、細胞重量5.6gに達したときに始めた。

#### 実施例 6

実施例3を繰返したが、細胞重量4.8gに達したとき、プロピオン酸1.2gを一度に添加した。

#### 実施例 7

実施例2を繰返したが、増培Aを用い、グルコースの代りにプロピオン酸を4g/hrの割合で、

醗酵中を全体を通じて供給した。

#### 実施例 8

実施例2を繰返したが、細胞重量が8.8gになつたとき、グルコースの代りに、グルコース5.2g/hr、プロピオン酸2.8g/hrの割合で、グルコースおよびプロピオン酸の混合物を醗酵器に供給した。

#### 実施例 9

実施例8を繰返したが、細胞重量2.8gに達したとき、グルコース6.8g/hrおよびプロピオン酸1.2g/hrの割合で、混合物の供給を開始した。

実施例2～9では、プロピオン酸は400g/lを含む溶液として添加した。

#### 実施例 10

実施例2を繰返したが、細胞重量が2.8gに達したとき、グルコースの代りにイソ酪酸を醗酵器に2g/hrの割合で供給した。イソ酪酸は、150g/lを含む溶液で添加した。

実施例3～6および8～10では、醗酵器に供給した酸の重量対細胞重量が2.6gに達した後

(どちらかの窒素が枯渇したとき)に醗酵器に供給したグルコースの重量および醗酵器に供給した酸の重量の合計の比が、第1表に示す値に達するまで、醗酵を継続した。

#### 実施例 11

実施例2を繰返したが、細胞重量が26.4gに達したとき、グルコースの代りに8-クロロプロピオン酸を4g/hrの割合で5時間醗酵器に供給した。

#### 実施例 12

実施例11を繰返したが、8-クロロプロピオン酸の供給は、細胞重量34.4gに達したときに開始した。

#### 実施例 13

実施例12を繰返したが、細胞重量80gに達したとき、8-クロロプロピオン酸4gを一度に添加し、次いでグルコースを6.8g/hrの割合で7時間供給した。

実施例11～13では、8-クロロプロピオン酸は、50g/lを含む溶液で添加した。

#### 実施例 14

実施例2を繰返したが、細胞重量3.1gになつたとき、グルコースの代りにアクリル酸を4g/hrの割合で5時間醗酵器に供給した。アクリル酸は、100g/lを含む溶液で添加した。

第 1 表

実施例	酸	酸供給比 (%)	最終細胞濃度 (g/l)	細胞中の重合体の量 (wt %)
2	なし	0	20.0	7.0
3	プロピオン酸	7.5	15.6	7.0
4	プロピオン酸	5.0	13.3	6.0
5	同上	8.8	16.0	7.0
6	プロピオン酸	4	13.0	6.8
7	同上	10.0	6.4	5.5
8	プロピオン酸	1.7	18.6	5.5
9	同上	9.5	14.2	6.7
10	イソ酪酸	6.6	18.0	5.0
11	8-クロロプロピオン酸	6.1	7.4	2.5
12	8-クロロプロピオン酸	8.8	4.5	2.0
13	同上	6.5	9.8	3.5
14	アクリル酸	5.0	6.0	2.5

注・ 酸供給比は、醗酵器に供給した酸の重量を、細胞乾燥重量26gに通した後に添加したグルコースの重量および醗酵器に供給した酸の重量の合計で除した商である。

実施例2～14の重合体中の共単量体単位量は、(a)加水分解およびガスクロマトグラフィーおよび(b)<sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトロスコピーにより決定した。

重合体の分子量は、ゲル透過クロマトグラフィーで決定した。

塩素分析も、実施例2、11、12および13の重合体について行つた。

結果を第2表に示した。

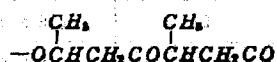
8-クロロプロピオン酸からの塩素は、殆んど重合体に見出されなかつた。したがつて、8-クロロプロピオン酸の代謝中にHClが失われて、得られる炭素-炭素二重結合は、水素化および水合されて、予期された2-クロロエチル基の代りに、R<sup>1</sup>としてエチルおよび2-ヒドロキシエチル置換基になつた。しかし、実施例11～13の重合体の塩素含有量は、若干の塩素が2-クロロエチル基として存在することを示している。

第 2 表

実施例	酸	$R_1$	単位IIのモル%		分子量		塩素 (ppm)
			NMRによる	加水分解およびガスクロマトグラフィによる	$M_w \times 10^{-4}$	$M_w/M_n$	
2	なし	—	0	0	292	2.75	40
3	プロピオン酸	エチル	27	33	207	4.23	
4	プロピオン酸	エチル	24	27	874	1.89	
5	同上	エチル	18	14	258	8.50	
6	プロピオン酸	エチル	6	3	848	1.66	
7	同上	エチル	25	26	886	1.70	
8	プロピオン酸	エチル	15	14	889	1.67	
9	同上	エチル	6	7	248	2.56	
10	イソ酪酸	エチル	80	29	274	2.88	
11	3-クロロプロピオン酸	エチル 2-ヒドロキシエチル	7 1.8	— —	888	2.99	475
12	3-クロロプロピオン酸	エチル 2-ヒドロキシエチル	4 1.2	— —	876	1.77	265
13	3-クロロプロピオン酸	エチル 2-ヒドロキシエチル	2 0.6	— —	811	1.99	45
14	アクリル酸	2-ヒドロキシエチル	6.5	—	858	2.86	

高分解能  $^{13}\text{C}$  NMR を用いて、実施例 8～10 の共重合体の単量体序列を調べた。カルボニル基の炭素原子から得られるシグナルは、その環境に応じて、異なる化学シフトで起きることが判明した。したがって、単位 I および II ( $n=1$ ,  $R^1=C_2H_5$ ,  $R^2=R^3=H$ ) を含む重合体では、可能な序列は次の通りである。

## A. ブチレート-ブチレート



## B. ペンタノエート-ペンタノエート



## C. ブチレート-ペンタノエート



実施例 2～10 の重合体の NMR 検査は、それぞれ 169.07、169.25 および 169.44 ppm で起きる 3 個の共鳴を示した。M. Iida 外 [Macromolecules 11 (1978) p490] によれ

ば、169.07 ppm での共鳴は、ブチレート-ブチレートの序列 A であり、169.44 ppm はペンタノエート-ペンタノエートの序列 B である。推論によれば、169.25 ppm でのシグナルは、ブチレート-ペンタノエートの序列 C から生じる。

実施例 10 の重合体の NMR の結果の定量的分析は、次の結果を与えた。

序列 A (ブチレート-ブチレート) 55%

序列 B (ペンタノエート-ペンタノエート) 14%

序列 C (ブチレート-ペンタノエート) 81%

これらの結果は、実施例 10 の重合体が単位 I および II ( $n=1$ ,  $R^1=C_2H_5$ ,  $R^2=R^3=R^4=H$ ) の共重合体を実質的量で含むことを、明らかに示している。しかし、繰返し単位 I のホモ重合体の若干も存在する可能性がある。

実施例 2～14 の重合体は、全部 D (一) 立体配置を有していた。

抽出したままの共重合体の熱的挙動は、コンピュータデータ分析付のジューボン 1090 システムを用いて、先ず差動熱計量法 (DSC) で決

定した。DSCを、190℃で圧縮成形し、完全に結晶化した製品を得るために、プレス中に冷却した後の試料でも実施した。それぞれの場合、見本は空气中で20℃/分で加熱し、スタート( $T_s$ )および吸熱溶解のピーク( $T_p$ )の温度をその面積とともに記録した。アニーリングした試料の加熱を200℃まで継続し、完全に溶解させるため1分間等温にした後、試料を液体窒素中で急冷した。非晶領域のガラス転移温度( $T_g$ )を決定するために、DSCを再び行つた。最後に、密度勾配浮遊法により、アニーリングした共重合体の密度を測定した。

結果を、第8表に示した。

第 8 表

実施例	抽出重合体のDSC			アニーリングした重合体のDSC				密度 ( $g/cm^3$ )
	$T_s$ °C	$T_p$ °C	面積(J/g)	$T_g$ °C	$T_s$ °C	$T_p$ °C	面積(J/g)	
2	140	188	100	5.9	140	191	127	1.256
3	120	125 166	5 20	-1.9	140	171	18	1.172
4	120	170	50	0.8	140	182	44	1.174
5	110	120 170	5 50	2.2	140	177	45	1.200
6	120	172	100	2.7	120	173	96	1.225
7	80	132	84	0.4	80	132	40	1.198
8	110	120 166	6 60	2.0	140	174	43	1.199
9	110	166	89	4.0	110	168	81	1.210
10	50	65 120 168	10 8 25	-2.0	130	172	26	1.188
11	110	170	57	5.0	120	180	73	—
12	110	177	86	4.1	120	178	86	1.182
13	100	172	98	5.9	120	171	96	1.218
14	110	172	84	2.7	110	174	75	1.212